

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1933-1934

N° 21

DÉCOMPOSITION ET SYNTHÈSE
DE LA CELLULOSE
PAR LES BACTÉRIES

THÈSE

Pour l'obtention
du Diplôme de Docteur de l'Université de Paris (Pharmacie)

Présentée et soutenue le juillet 1934

PAR

Yvonne KHOUVINE

DOCTEUR ÈS SCIENCES
ASSISTANTE A L'INSTITUT DE BIOLOGIE PHYSICO-CHIMIQUE

JURY { MM. GORIS..... *Président.*
 PERROT..... *Professeur.*
 DELABY..... *Agrégé.*

PARIS

HERMANN ET C^{ie}, ÉDITEURS

6, RUE DE LA SORBONNE, 6

—
1934

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1933-1934

N° 21

DÉCOMPOSITION ET SYNTHÈSE
DE LA CELLULOSE
PAR LES BACTÉRIES

THÈSE

Pour l'obtention
du Diplôme de Docteur de l'Université de Paris (Pharmacie)

Présentée et soutenue le juillet 1934

PAR

Yvonne KHOUVINE

DOCTEUR ÈS SCIENCES
ASSISTANTE A L'INSTITUT DE BIOLOGIE PHYSICO-CHIMIQUE

JURY { MM. GORIS..... *Président.*
 PERROT..... *Professeur.*
 DELABY..... *Agrégé.*

PARIS

HERMANN ET C^{ie}, ÉDITEURS

6, RUE DE LA SORBONNE, 6

—
1934

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

Administration

MM. P. GUÉRIN, Doyen, O. ✱, ② I.
P. LEBEAU, Assesseur, O. ✱, ② I.
P. DESPORT, Secrétaire, ✱, ② I.

Professeurs

MM. GUÉRIN, O. ✱, ② I. Botanique générale.
BÉHAL, Membre de l'Institut,
G. O. ✱, ② I. Chimie organique.
PERROT, O. ✱, ② I. Histoire naturelle des Médicaments.
COUTIERE, O. ✱, ② I. Zoologie.
LEBEAU, O. ✱, ② I. Pharmacie chimique.
BOUGAULT, ✱, ② I. Chimie analytique.
GORIS, ✱, ② I. Pharmacie galénique.
TASSILLY, O. ✱, ② I. Physique.
DAMIENS, ✱, ② I. Chimie minérale.
HÉRISSEY, O. ✱, ② I. Chimie biologique.
SOMMELET, ✱, ② I. Hydrologie et Hygiène.
LUTZ, ✱, ② I. Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, ✱, ② I. Toxicologie.
LAUNOY, O. ✱, ② I. Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. ✱, ② I.

Professeurs honoraires : MM. DÉLÉPINE, O. ✱, ② I.
GUERBET, O. ✱, ② I.

Chargés de cours

MM. Marc HONNORAT, ✱, ② I. Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LAUNOY, O. ✱, ② I. Pharmacodynamie.
DELABY, ✱, ② I. Minéralogie.
PICON, ② I. Chimie minérale.
BACH, ② I. Microbiologie.

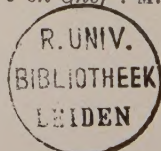
Agrégés en exercice

MM. DELABY, ✱, ② A.	MM. MASCRÉ, ② I.	MM. BEDEL, ② I.
PICON, ② I.	FLEURY, ② I.	RÉGNIER, ② I.
	BACH, ② I.	

Chefs des travaux pratiques

MM. BEDEL, ② I., agrégé, chargé des T. P. de
1^{re} année Chimie générale.
FLEURY, ② I. et RÉGNIER, ② I., agrégés,
chargés des travaux de Chimie analytique.
SOUÈGES, ② I. Micrographie.
LEROUX, ② I. Physique.
DEVAL, ✱, ② I. Microbiologie.
DELABY, ✱, ② I., PICON, ② I. et
MASCRÉ, ② I., agrégés, chargés des . . . Travaux généraux de 4^e année.

Bibliothécaire en Chef : M. BERNARD, ② I.





DÉCOMPOSITION ET SYNTHÈSE DE LA CELLULOSE PAR LES BACTÉRIES

INTRODUCTION



ous voulons dans ce travail étudier la décomposition et la synthèse de la cellulose par les bactéries.

Mais il faudrait d'abord, pour bien faire, définir la cellulose.

Or, ce n'est pas facile, ou plutôt ce n'est pas possible dans l'état actuel de la science, pas plus d'ailleurs qu'il n'est possible de définir à présent d'autres corps naturels comme l'amidon, le glycogène ou l'inuline, holosides de formule globale $(C^6H^{10}O^5)^n$ qu'on ne peut faire cristalliser, qui n'ont pas de point de fusion, qui ne se dissolvent pas dans les solvants ordinaires de la chimie et dont les poids moléculaires, mal connus, sont assez élevés.

C'est pourquoi, faute d'une définition précise de la cellulose, force nous sera bien de la caractériser par quelques-unes de ses propriétés principales qui relèvent de disciplines diverses : botanique, chimie, cristallographie.

Les botanistes, dans leurs coupes histologiques, la reconnaissent à ce qu'elle se colore directement par le rouge Congo, par toute une série de colorants azoïques et aussi, après action des acides ou du chlorure de zinc, par l'iode.

Pour les chimistes la cellulose est un résidu de purification de matières végétales, soluble dans le réactif de Schweizer et dans l'acide sulfurique concentré, donnant par hydrolyse totale du glucose et, par hydrolyse ménagée, du cellobiose, du procellose, du cellotétrose, du cellopentose et du cellohexose.

Les cristallographes, eux, mettent à profit les phénomènes de biréfringence pour affirmer, conformément à la conception de J. Duclaux, que les fibres cellulosiques ont une structure « en cheminée de briques » analogue à celle de petits éléments cristallins disposés en couches successives autour d'un axe, conception que confirme, en outre, l'étude des diagrammes de rayons X.

Quelle que soit la provenance de la cellulose, qu'elle soit animale ou végétale, le diagramme de diffraction est toujours le même. Son aspect, intermédiaire entre l'aspect du diagramme d'une poudre microcristalline et l'aspect du diagramme d'un cristal tournant, ne dépend, selon Herzog et Jancke, que du pas des hélices suivant lesquelles sont disposés, dans la fibre, les éléments cristallins.

Les angles de diffraction et la maille élémentaire sont les mêmes pour toutes les celluloses. On en peut conclure par conséquent à leur identité cristallographique.

Enfin, l'étude des diagrammes de ramie fait connaître la dimension de cette maille suivant l'axe d'orientation commun à tous les cristallites. Elle est de $10,3 \text{ \AA}$ et correspond à la longueur d'un groupe cellobiose construit avec des atomes de carbone et des atomes d'oxygène ayant respectivement $1,5 \text{ \AA}$ et $1,2 \text{ \AA}$.

Divers modèles de cellobiose ont été proposés. Haworth adopte en général le schéma ci-dessous :

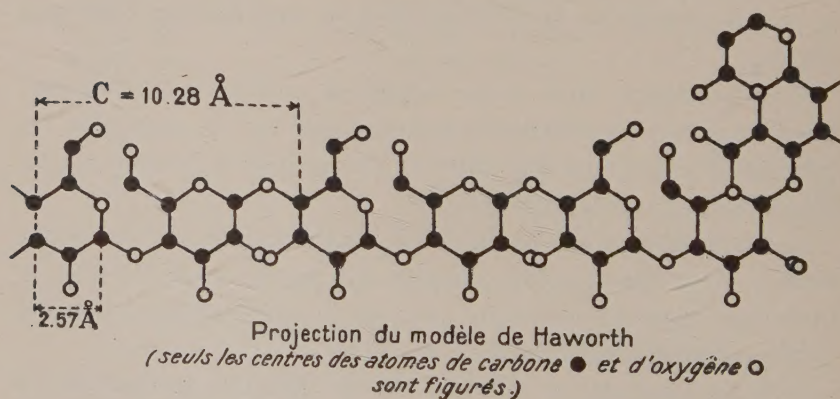


FIG. 1.

Il semble donc que ce soient les cristallographes qui nous fassent le mieux connaître la structure de la cellulose. Guidés par

les résultats des chimistes, ils arrivent par leurs procédés à des conclusions qui le plus souvent confirment ces résultats.

La cellulose ainsi caractérisée ne peut plus être confondue avec les hémicelluloses comme on l'a fait parfois.

Pour certains microorganismes elle est la seule source de carbone qu'ils puissent utiliser. D'autres microorganismes en font aisément la synthèse à partir de beaucoup de corps. Nous étudions les principaux. Ceux qui décomposent la cellulose sont néanmoins en tel nombre que nous laissons de côté les moisissures et les Actinomycètes, très actifs dans certains cas comme le montrent Waksman et ses collaborateurs, pour n'étudier que les bactéries.

Les microorganismes qui synthétisent la cellulose font tous partie, au contraire, du même groupe de bactéries et ne sont peut-être que des races d'une seule espèce. L'une d'elles, l'*Acetobacter xylinum*, bien connue sous le nom de Bactérie du sorbose, par les travaux de G. Bertrand, nous a servi à faire la synthèse de la cellulose.

*
**

Nous avons étudié la décomposition de la cellulose par les bactéries, à l'Institut Pasteur, dans le laboratoire du Docteur M. Weinberg, à son instigation et souvent aidée de ses conseils, et dans le laboratoire de G. Bertrand dont la grande expérience nous a toujours été si précieuse pour la connaissance de la biochimie de l'espèce que nous avons isolée.

Nous étudions en ce moment à l'Institut de Biologie Physico-chimique, dans le service de E. Aubel qui veut bien s'intéresser à nos travaux, le métabolisme de l'*Acetobacter xylinum*.

Dans ces différents laboratoires, nous avons toujours travaillé dans les meilleures conditions. C'est dire avec quelle reconnaissance nous remercions MM. M. Weinberg, G. Bertrand et E. Aubel.

Nous remercions aussi très vivement M. A. Goris d'avoir bien voulu accepter la présidence de notre jury de thèse et MM. E. Perrot et R. Delaby d'avoir bien voulu en être membres.

Que MM. Perrot et Goris veuillent bien trouver ici l'expression de notre gratitude émue pour avoir conservé un vif souvenir de celui de leurs amis dont la mémoire nous est chère entre toutes.

PREMIÈRE PARTIE

DÉCOMPOSITION DE LA CELLULOSE PAR LES BACTÉRIES

Depuis 1850 on étudie la décomposition de la cellulose par les bactéries. Mitscherlich, le premier, remarque, dès cette époque, que les membranes des cellules de pomme de terre en macération dans l'eau sont détruites par un vibrion ; une dizaine d'années après lui, Trécul d'abord, van Tieghem ensuite n'observent plus, dans les mêmes conditions, un vibrion, mais un bacille épais, sporulé, dont le protoplasme est coloré par l'iode en bleu : le *Bacillus amylobacter*. Il est à peu près certain qu'il ne s'agit pas là d'une destruction de cellulose vraie, mais plutôt d'une destruction d'hémicelluloses.

Hoppe-Seyler, Popoff, Tappeiner, Dehérain, Schlöesing père et fils montrent plus tard que l'action bactérienne a lieu sans aucun doute aux dépens de la cellulose et que les produits de fermentation sont des gaz : anhydride carbonique, méthane, hydrogène et des acides gras volatils, en particulier des acides acétique et butyrique. Il résulte aussi de leurs recherches que les bactéries peuvent être aérobies ou anaérobies et que les températures optima de décomposition sont assez variables.

Viennent ensuite un nombre très grand de travaux ayant pour objet l'isolement en culture pure des bactéries qui attaquent la cellulose. Nous n'avons pas l'intention de les passer intégralement en revue ni de décrire en détail toutes les espèces.

Beaucoup d'essais d'isolement ont été infructueux. Il semble que presque toujours on se heurte à cette difficulté : lorsque, dans un milieu de composition donnée, le nombre des espèces banales

qui modifient ce milieu, diminue, la cellulose est moins facilement attaquée. C'est pourquoi quelques auteurs ont pensé que la décomposition de la cellulose par les microbes, en particulier par les anaérobies, est due à des symbioses.

Avant d'admettre cette conclusion il faut se rappeler que la cellulose, dans la nature, disparaît là où les matières organiques sont déjà fortement dégradées (tubes digestifs, sols, fumiers, eaux résiduaires) et que les solutions minérales électives ou les différents milieux à base de bouillon de viande ne possèdent peut-être pas les éléments nécessaires au développement de ces bactéries spéciales. Il convient donc de modifier les milieux de culture, et nous verrons qu'on peut alors isoler les anaérobies eux-mêmes en culture pure.

Pour faciliter l'étude des bactéries qui décomposent la cellulose, nous les diviserons en trois groupes :

- 1° les bactéries aérobies,
- 2° les bactéries anaérobies,
- 3° les bactéries thermophiles,

en signalant toutefois que les recherches de Meyer et de Pochon, toutes récentes et que nous venons de lire après la composition de ce travail, tendent à montrer que cette division est très arbitraire et que les bactéries cellulolytiques s'adapteraient à des changements de conditions de vie.

Meyer prétend même qu'il n'y aurait qu'une forme, à spore terminale ovale, celle précisément que nous avons isolée et que nous décrivons plus loin, à la page 14, parmi les anaérobies. Toutes les autres formes, à l'en croire, en dériveraient.

Cependant, nous conservons cette division qui s'applique aux microbes étudiés jusqu'ici.

BACTÉRIES AÉROBIES

Van Iterson enfouit dans le sol un chiffon de lin et un morceau de papier filtre. Au bout de six mois il ne retrouve plus trace du papier, mais il reste quelques débris de chiffon ramolli d'où il isole un bacille, le *Bac. ferrugineus*, qui désagrège le papier en lui donnant une couleur jaune brun. C'est un petit bâtonnet mobile, toujours accompagné d'un microcoque.

Merker ne peut séparer du *Micrococcus cytophagus* qui colore la cellulose en jaune, ni du *Micrococcus melanocyclus* qui la colore en noir ou en rouge, une forme filamenteuse non cellulolytique.

Kellerman, McBeth, Scales et Smith sont les premiers auteurs ayant décrit une trentaine d'espèces aérobies pures, formes filamenteuses de $0,8\ \mu$ à $3,5\ \mu$ qui, en milieu liquide, réduisent le papier en poussière et ne donnent pas de gaz, mais des acides. Elles attaquent la glycérine, la mannite, l'amidon, les sucres tels que le glucose, le lactose, le saccharose ou le maltose et réduisent les nitrates en nitrites. Ces auteurs préparent une gélose spéciale à base de cellulose reprecipitée de la solution de Schweizer, c'est-à-dire à base d'une cellulose partiellement hydrolysée. Sur cette gélose ils observent des colonies entourées d'une zone claire due, d'après eux, à l'action d'une enzyme qui diffuse dans le milieu et agit sur la cellulose. Cette zone claire a été souvent mise en doute. On l'a attribuée à la dissolution du carbonate de calcium par les acides formés ou à la destruction des produits organiques de l'agar. On a, de plus, reproché à Kellerman et à ses collaborateurs d'avoir donné beaucoup de détails sur les caractères secondaires de leurs espèces et d'avoir été très brefs sur la disparition de la cellulose. Mais l'étude quantitative faite avec

quelques souches, conservées dans des collections ou récemment isolées, a montré à Bradley et Rettger, et à Skinner que le pouvoir dissolvant peut être conservé plusieurs années, et que 8 à 14 0/0 de la cellulose disparaît. Ces chiffres sont évidemment très faibles, mais ils prouvent néanmoins que la cellulose est décomposée par les *Bact. flavigenum*, *fimi*, *liquatum*, *udum*, par les *Bac. bibulus*, *gelidus*, *subalbus*, *amylolyticus*, *cellulaseus* et par *Ps. perlurida*. On peut retenir aussi des essais de Bradley et Rettger l'emploi de la peptone de caséine pour faire des cultures sans cellulose, les bactéries ne perdant pas leur pouvoir solvant.

L'espèce qui a été le mieux étudiée est le *Spirochæta cytophaga* d'Hutchinson et Clayton. C'est de beaucoup l'aérobie le plus actif, le plus répandu et le plus nombreux. On l'a retrouvé aussi bien en Europe qu'en Amérique, et Dubos en a compté de 50.000 à 50.000.000 par g. de terre, selon les échantillons. C'est un filament droit ou incurvé de $3-40 \mu \times 0,3-0,4 \mu$. Il n'a pas de cils, n'est animé que de quelques mouvements de translation ou d'ondulation et se termine à l'une de ses extrémités par un renflement sphéroïdal, fréquent surtout dans les cultures anciennes et qui ressemble à une spore ou à un coccus. Les deux formes du *Spirochæta cytophaga* sont tuées en dix minutes à 60°. Il préfère, comme sources d'azote, les matières azotées simples : nitrates, sels ammoniacaux, amides, amino-acides à faible concentration, et la cellulose seule peut lui servir de source de carbone. Il la transforme sans donner de gaz, en mucilage, en un pigment jaune voisin des carotinoides et en acide butyrique.

L'étude du *Spirochæta cytophaga* a été reprise, il y a quelques années, par Winogradsky, sur des plaques de silico-gel imprégnées de solution nutritive et recouvertes d'un morceau de papier ou de chiffon. En déposant sur ces plaques quelques grains de terre il obtient, sans isoler le *Spirochæta*, des cultures où cet organisme domine. Il croit que les sporoides sont des formes de contamination très abondantes dans les vieilles cultures et que le mucilage est de « l'oxycellulose ». Il propose de créer un genre *Cytophaga* et de distinguer quelques espèces : le *Cytophaga rubra* colorant le papier en rouge brique, le *Cytophaga lutea* assez rare, colorant le papier en jaune et le *Cytophaga tenuissima* d'une extrême finesse, dont le mucus est olivâtre ou verdâtre.

La place que le *Spirochæta* d'Hutchinson et Clayton doit occu-

per dans la classification ne semble pas définitive, car Bokor, qui a pu observer des filaments ramifiés perpendiculairement, en fait un Actinomycète sous le nom de *Mycococcus cytophagus*. Quoi qu'il en soit, on doit retenir l'importance du rôle joué dans le sol par cette espèce.

Grønewege étudie trois variétés α , β , γ , d'un *Bacillus cellaresolvens* qui agit moins sur la cellulose en culture pure qu'en symbiose avec des bactéries dénitrifiantes. Ces dernières peuvent utiliser les produits de fermentation cellulosique tels que les acides acétique, butyrique et lactique en les oxydant en gaz carbonique et en eau. Grønewege a également montré que les *Bac. cellaresolvens* α , β et γ forment du cellobiose, du glucose, qu'ils sécrètent une cellulase, une cellobiase et qu'on peut observer la formation d'une zone d'enzyme par l'emploi d'une cellulose imprégnée de rouge Congo. Le colorant ne diffuse que sous l'action de l'enzyme, et les colonies sur cellulose-agar sont entourées d'une zone colorée.

De nombreuses bactéries et quelques cocci ont été étudiés par Sacks, Gray et Chalmers, Dubos, Winogradsky, Skinner, Baker, Jensen, Rubentschik, Simola, Bojanowsky. Nous ne retiendrons pas la description de toutes ces espèces, mais plutôt ce qui caractérise certaines d'entre elles seulement.

Winogradsky, sur plaque de silico-gel additionnée de cellulose remarque des colorations crème, jaunes, ocre, vertes ou brunes, produites par des vibrions ou des formes en faucilles. Il a pu montrer la production par *Cellfalcicula fusca* d'un produit qui, après hydrolyse à chaud par l'acide sulfurique, réduit la liqueur cupro-potassique. Les organismes étudiés par Rubentschik transforment la cellulose en matières solubles dans la soude à 20/0 ; ceux de Simola donnent du cellobiose et du glucose, et ceux de Bojanowsky ne poussent pas si le milieu de culture ne contient pas de fer.

Le nombre des bactéries aérobies décomposant la cellulose augmentant sans cesse, Winogradsky propose de les classer. A côté du genre *Cytophaga*, il suggère de garder aux bactéries « leurs anciens noms se rapportant à la forme, mais en ajoutant l'abréviation *Cell* ; on dirait ainsi *Cellvibrio*, au lieu de *Vibrio*, en précisant par ce nom générique la forme et la fonction. Pour désigner l'espèce, on profiterait du caractère macroscopique le

plus manifeste, par exemple la teinte du papier attaqué sur le milieu-type pour dire par exemple : *Cellvibrio ochracea* ⁽¹⁾ ». Il crée également le genre *Cellfalcicula*. Ces formes, ainsi que les différents genres de *Cytophaga* qu'il a distingués, ont été retrouvés, notamment par Turneròvna et par Rubentschik.

*
* *

Le nombre actuellement connu des aérobies décomposant la cellulose est très grand. On les trouve surtout dans les sols bien aérés, neutres ou basiques, mais assez humides, où ils pullulent. Waksman et Dubos ajoutent de la cellulose à un sol humide et dénombrent, au bout de quelques jours, plusieurs milliards d'individus par gramme de sol.

Leur rôle dans le tube digestif est toutefois négligeable à côté de celui des anaérobies que nous allons décrire maintenant.

(1) S. Winogradsky. Etudes sur la microbiologie du sol (4^e mémoire). Sur la dégradation de la cellulose dans le sol. *Ann. Inst. Pasteur*, 43, 1929, 549.

BACTÉRIES ANAÉROBIES

Bien que les décompositions anaérobies de la cellulose aient été les premières connues et longtemps les plus étudiées, le nombre des bactéries isolées est très petit. Cela tient à ce que les espèces qui vivent en l'absence d'air poussent difficilement dans les milieux usuels et que le pouvoir fermentaire diminue au fur et à mesure de la purification. De plus il n'est pas toujours aisé d'obtenir des colonies. Il faut, si l'on veut purifier les souches, user d'artifices qui ne donnent pas toujours de bons résultats. Heureusement que ces espèces ont des spores, en général très résistantes à la chaleur. On peut donc détruire les espèces banales plus sensibles ou non sporulées. C'est grâce à cette propriété et à l'emploi de milieux électifs qu'Omeliansky obtient deux bacilles de caractères morphologiques voisins, mais de propriétés physiologiques différentes : le *Bac. fossicularum* ou bacille de la fermentation hydrogénée et le *Bac. methanigenes* ou bacille de la fermentation méthanique.

Pour obtenir le *Bac. fossicularum*, il suffit de chauffer les cultures quinze minutes à 75°, dès le premier ensemencement dans le milieu de Winogradsky composé de :

K ² HPO ⁴	1 g.
MgSO ⁴	0,5
(NH ⁴) ² SO ⁴	1 g.
NaCl	traces
H ² O.	1.000

et additionné de cellulose et de carbonate de calcium.

Après quelques repiquages, il ne reste plus, à côté d'un bacille à spore ovale non cellulolytique, qu'un mince bâtonnet, Gram négatif, de $4 \text{ à } 8 \mu \times 0,5 \mu$. Sa spore de $1,5 \mu$ est parfaitement sphérique. De vieilles cultures ne montrent plus que des spores qu'on peut tuer par vingt minutes de chauffage à 90° . Le *Bac. fossicularum* n'attaque que la cellulose en donnant du gaz carbonique, de l'hydrogène, des alcools non caractérisés et, en quantité variable, des acides acétique, butyrique, valérianique. Le pourcentage de cellulose décomposé est presque de 96 0/0.

Si l'on ne chauffe pas dès le premier ensemencement, on obtient le *Bac. methanigenes* dont la spore germe plus vite que celle du *Bac. fossicularum*. Après quelques repiquages on peut chauffer les cultures afin de l'avoir pur. Il a également la forme d'un mince bâtonnet à spore terminale sphérique, mais cette spore n'a que 1μ de diamètre et il décompose la cellulose en donnant du gaz carbonique, du méthane, des acides acétique et butyrique. Pas plus que le *Bac. fossicularum*, il ne se colore en bleu par l'iode.

Ces deux espèces ont des propriétés communes à d'autres anaérobies décomposant la cellulose : elles n'attaquent ni les monoses, ni les polyoses, ni les polyalcools, mais seulement la cellulose ; de plus elles donnent difficilement des colonies. Celles qu'Omeliansky a pu voir sur pomme de terre n'ont été cause, après repiquage en milieu liquide, d'aucune fermentation.

En suivant la technique d'Omeliansky on a très souvent obtenu, la plupart du temps sans chercher à faire de véritables isolements mais plutôt pour étudier les conditions et les produits de fermentation, on a très souvent obtenu les fermentations hydrogénée et méthanique. C'est ainsi, par exemple, que Pringsheim fait varier les rapports des acides et des gaz en changeant les conditions de culture ; qu'il peut identifier le glucose, produit intermédiaire, après avoir arrêté le développement microbien par du toluène, et que Rubenschik voit que le *Bac. methanigenes* se développe dans des milieux contenant 5 0/0 de chlorure de sodium.

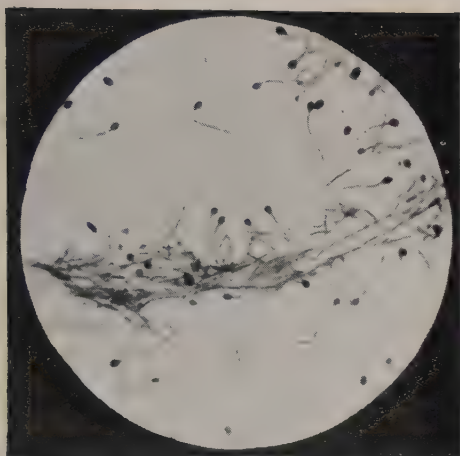
Parmi les travaux relatifs à la pureté et à l'isolement des bacilles d'Omeliansky, nous retiendrons ceux de Kellermann et ceux de Clausen.

Kellermann et McBeth prétendent avoir isolé, de souches mises à leur disposition par Omeliansky, des aérobies non sporu-

lés qui attaqueraient la cellulose sans donner de gaz et des anaérobies sporulés donnant des gaz, mais sans action sur la cellulose. Omeliansky n'admet pas ces conclusions. Les bacilles qu'il a décrits ont été, en effet, si souvent rencontrés dans les sols, les fumiers, les eaux d'égouts, les boues, les matières fécales, qu'on ne peut croire qu'on a toujours confondu une fermentation anaérobie avec une fermentation aérobie. Du reste, l'étude faite par Clausen, il y a deux ans, confirme l'existence de bâtonnets anaérobies à spore ronde, capables d'attaquer la cellulose. Mais pour cet auteur, il n'existerait plus qu'une seule espèce dont les différences morphologiques s'atténuent par la culture et qui ne donne que de l'hydrogène. Il a pu obtenir des colonies sur des plaques de gélose à base de bouillon additionné d'asparagine. Que ces colonies proviennent de cultures chauffées ou non, elles ne donnent qu'une seule espèce : le *Bac. fossicularum*. A l'état pur, il ne produirait que peu de gaz et ne serait pas très actif, mais en association avec le *Bac. putrificus* Zeissler il donne autant de gaz qu'une fermentation brute, et la quantité de cellulose détruite est grande. Il faut retenir aussi des essais de Clausen l'emploi d'un bouillon filtré sur bougie, après culture du *Bac. putrificus* Zeissler. Ce bacille transforme probablement les protéides du bouillon et les rend assimilables par les bacilles d'Omeliansky.

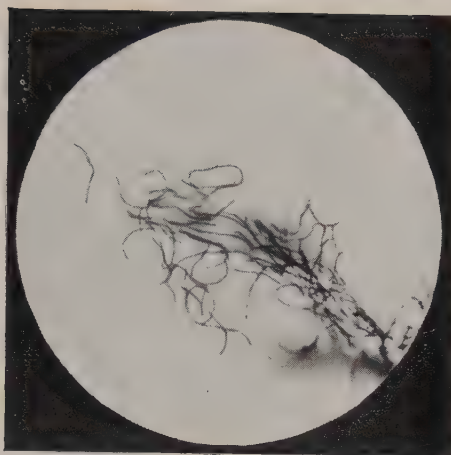
Enfin Cowles et Rettger isolent une espèce qu'ils appellent *Cl. cellulosovens* (*n. sp. ?*) et qui n'est probablement qu'un bacille d'Omeliansky.

Un autre anaérobie pur, le premier en date dont il fut possible d'affirmer la pureté, c'est le *Bac. cellulosæ dissolvens* que nous avons d'abord trouvé dans l'intestin de l'homme, puis dans ceux du cobaye, du lapin, du mouton, du bœuf, du cheval, et enfin dans des sols siliceux, argileux, dans des terres de jardin, et même dans un tchernoziom conservé vingt ans sous enveloppe. Cette espèce très répandue, est assez difficile à isoler, car elle ne donne pas de colonies sur milieu solide. Comme elle a une spore très résistante à la chaleur on peut, en combinant le chauffage des cultures avec le lavage des fibres sur lesquelles elle pousse, obtenir des souches pures. Encore faut-il, après quelques cultures d'enrichissement sur le milieu de Winogradsky, modifier la composition du milieu et adopter celui-ci :



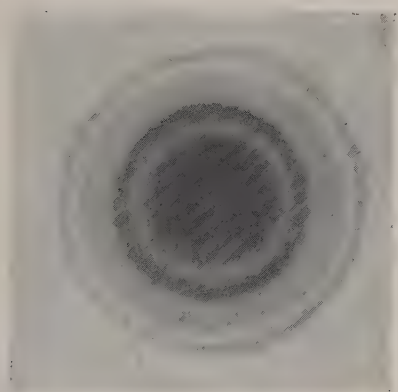
Cliché P. Jeantet

Bac. cellulosa dissolvens.
Forme sporulée normale.



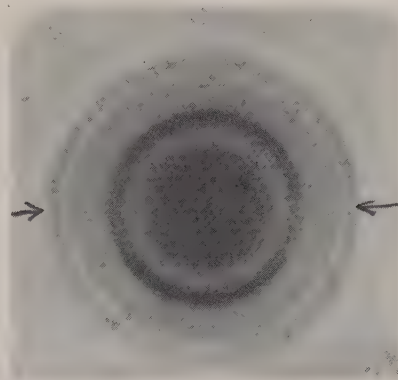
Cliché P. Jeantet

Bac. cellulosa dissolvens.
Forme non sporulée dégénérée.



Cliché O. Binder

Linters de Coton.



Cliché O. Binder

Acetobacter xylinum.

Diagrammes de rayons X. Cu. K α . K β .

K ² HPO ⁴	1 g.
NaCl	1 g.
Peptone pancréatique	1 g.
CaCO ³	2 g.
H ² O	750 cm ³
Extrait fécal à 10 0/0 stérilisé à 110° . .	250 cm ³
Cellulose	10 g.

Dans ce milieu, nous avons conservé une souche 3 ans sous le vide, en tube scellé, et fait des centaines de passages sans jamais remarquer le moindre changement morphologique ou dans la fermentation. Il est probable que la source d'azote de l'extrait fécal convient parfaitement à la bactérie.

Le *Bac. cellulosaë dissolvens* a la forme d'un bâtonnet sporulé plus ou moins sinueux de 2,5 à 12,5 μ de long. Ses spores ovales ont 2,5 $\times$ 2 μ . Il n'a pas de cils et ne se colore pas par la méthode de Gram. Il vit attaché à la fibre cellulosique par son extrémité non sporulée entre 35 et 50°, sans qu'on puisse remarquer un optimum entre 38 et 50°. C'est un anaérobie strict qui ne se développe que si la tension de l'air n'est pas supérieure à 12 mm. de mercure. Sa spore résiste quarante-cinq minutes à l'ébullition.

Il ne pousse sur aucun des milieux usuels. Cela peut servir à contrôler la pureté des souches. Les milieux ensemencés peuvent rester un mois et demi à l'étuve sans devenir troubles.

Après quelques passages dans du bouillon Martin additionné de cellulose, la morphologie et la physiologie du *Bac. cellulosaë dissolvens* se modifient : il devient plus court, n'a plus de spores, le dégagement gazeux est faible et le papier est tout simplement ramolli. Remis dans le milieu qui lui convient il recouvre toutes ses propriétés. Il décompose la cellulose en formant du gaz carbonique, de l'hydrogène, de l'alcool éthylique, des acides acétique et butyrique, un pigment jaune orange et une petite quantité de saccharides précipitables par l'alcool et hydrolysables par l'acide chlorhydrique à 1 0/0 au bain-marie bouillant. Il n'attaque aucun sucre, aucun polyalcool. Seule la cellulose peut lui servir de source de carbone.

En culture impure, la quantité de cellulose disparue est environ 3 fois plus grande qu'en culture tout à fait pure. Le pigment qui semble recouvrir les fibres ne se produit pas. Il est probable-

ment utilisé par la flore associée, décomposition qui permet au bacille spécifique de rester en contact avec la fibre et de continuer à la détruire.

Bien qu'on ne puisse voir de colonies sur milieu solide, l'agar n'empêche pas le *Bac. cellulosaë dissolvens* de pousser. Nous avons fait des tubes de gélose profonde avec de la cellulose très finement divisée et nous avonsensemencé avec une souche pure. Il nous est arrivé d'obtenir des cultures tout à fait normales par repiquage, en milieu liquide, de fibrilles attaquées. Un morceau de papier, au fond d'un tube de gélose, est même devenu transparent et s'est coloré en jaune. On ne peut toutefois se servir de cette technique pour des isollements, car il faut ensemencer large et on a toujours ainsi de nombreuses chances de repiquer quelques microbes de contamination. C'est pourquoi nous avons préféré les lavages, les dilutions et le chauffage des cultures. Avec un peu de patience on obtient des espèces pures. Bien que certains auteurs aient mis en doute la pureté du *Bac. cellulosaë dissolvens*, pour cette raison qu'il n'a pas été obtenu à partir d'une colonie, nous sommes, nous, certaine de sa pureté. Il est absolument impossible d'avoir, pendant des centaines de passages d'une souche, plusieurs microbes qui soient différents, bien qu'ils aient même morphologie, mêmes températures de développement, même résistance des spores et qu'ils n'attaquent que la cellulose, laissant tous les milieux stériles.

Le *Bac. cellulosaë fermentans* que Werner a trouvé dans l'intestin des larves de *Potosia cuprea* est très proche du *Bac. cellulosaë dissolvens*. Il a également une spore ovale, ne prend pas le Gram, ne donne pas de colonie, n'attaque aucun sucre, décompose la cellulose et ne décompose qu'elle en anhydride carbonique et en hydrogène, mais il a des cils péritriches et colore le papier en gris ou en brun.

Le *Plectridium cellulolyticum* de Pochon est, lui aussi, voisin morphologiquement du *Bac. cellulosaë dissolvens*, bien qu'il donne, outre des spores ovales, des spores rondes. Mais il en diffère surtout par ses propriétés physiologiques : il peut, en effet, attaquer l'arabinose, le glucose, le galactose, la glycérine et la mannite, se développer à un pH voisin de 8, pousser dans des milieux synthétiques, donner des colonies sur gélose préparée avec du liquide de la panse du bœuf et même s'adapter à la vie en pré-

sence d'air. En aérobiose, cependant, il n'attaque plus la cellulose.

Une race de *Bac. cellulosa dissolvens*, récemment isolée par Snieszko, diffère de celle que nous avons étudiée par sa température optima de développement, à 60°. Pour l'isoler, Snieszko ajoute à son milieu des cellules de *Sterigmatocystis nigra*. Il peut ainsi employer de grandes dilutions et avoir, pratiquement, des cultures à partir d'une seule bactérie.

Werner et Snieszko sont, par des techniques qui diffèrent de celles que nous avons suivies, arrivés au même résultat que nous. Si les bacilles de ces deux auteurs et le nôtre ne sont pas absolument les mêmes, ils sont tellement voisins par leurs propriétés qu'on peut les tenir pour des races d'une même espèce.

Il nous reste à mentionner l'*Amylobacter navicula*, déjà décrit par Wehmer et isolé par Clausen. C'est une espèce dont la morphologie et la physiologie sont proches de celles des ferments butyriques. L'*Amylobacter navicula* est un gros bacille à spore centrale qui prend le Gram et que l'iode colore en rouge. Il est facile de l'isoler après quelques cultures dans une solution inorganique additionnée de cellulose. En effet, il suffit de chauffer les milieux cinq minutes à 80° dès le troisième repiquage, pour qu'on puisse obtenir, au sixième ensemencement, des colonies sur D-agar Bredeman ou sur gélose au bouillon de légumes.

L'*Amylobacter navicula* attaque la cellulose avec production d'anhydride carbonique et d'hydrogène. Clausen ne mentionne aucun autre produit. Bien plus, les analyses de gaz ont été faites pour des fermentations de cellulose en présence de glucose, mais on ne sait pas exactement ce qui est produit par chacun de ces corps. Enfin l'*Amylobacter navicula* serait le seul organisme ayant à la fois la propriété de décomposer la cellulose et de fixer l'azote libre.

*
* *

Quelle est l'importance des bactéries anaérobies ?

Tous les auteurs sont d'accord pour les rendre responsables de la fermentation cellulosique dans les fumiers, dans les eaux d'égouts, dans le tube digestif de l'homme, des animaux et des insectes ; mais leur rôle dans le sol est discuté, bien qu'il nous

semble incontestable. Toutes les espèces, en effet, que nous avons décrites se trouvent aussi bien dans le sol que dans le tube digestif, et des numérations faites par Duggeli montrent qu'il y a dans 1 gramme de sol jusqu'à 1.000 anaérobies. Or, il suffit que le sol soit saturé d'eau ou que l'on y enfouisse des matières végétales ou que l'activité des aérobies raréfie l'oxygène pour que les anaérobies pullulent et décomposent la cellulose.

Nous avons souvent remarqué qu'il est inutile de faire le vide pour les premières cultures d'enrichissement d'anaérobies. L'activité de la flore de contamination prive le milieu d'oxygène, et la cellulose est décomposée après quelques jours. Snieszko a vu, lui aussi, qu'il n'est pas toujours nécessaire de faire le vide, même dans les cultures pures. Il faut que le bleu de méthylène soit décoloré au fond du tube, c'est-à-dire que le milieu contienne assez de substances « tampons » vis-à-vis de l'oxygène. Or, il est évident que dans un sol où de grandes quantités de matières organiques sont détruites, cette condition est très souvent réalisée.

BACTÉRIES THERMOPHILES

On appelle « bactéries thermophiles » des organismes qui se développent entre 60 et 70° et qui sont aérobies ou anaérobies.

Bien que l'on connaisse, depuis 1890, par les travaux de Macfayden et Blaxall, les fermentations thermophiles de la cellulose, on n'a décrit jusqu'à présent que peu d'espèces.

Dans des cultures mixtes, Pringsheim montre la présence de cellobiose et de glucose. Pour que ces deux sucres s'accumulent dans la solution il suffit d'ajouter du toluène et de laisser les diastases agir quelques jours à 20°.

Lymn et Langwell ne décrivent pas complètement un microbe sporulé qui pousse entre 80 et 88°, forme des colonies sur gélose glucosée et décompose la cellulose en gaz carbonique, méthane, hydrogène, alcool éthylique et acide acétique. Ils disent pouvoir transformer, grâce à cet organisme, les matières végétales en alcool éthylique et provoquer des maturations de fumiers. La présence simultanée d'hydrogène et de méthane laisse croire que la souche de Lymn et Langwell est impure, le méthane étant sans doute un produit de fermentation secondaire.

Le *Clostridium thermocellum* de Viljoen, Fred et Peterson est un bâtonnet cilié, à spore ovale, qui ne prend pas le Gram et qui, non seulement attaque la cellulose, mais encore beaucoup de sucres et même l'amidon. La fermentation commence après dix-huit heures et donne du gaz carbonique et de l'hydrogène, de l'alcool éthylique, des acides acétique et butyrique, ainsi qu'un pigment jaune brun. Les colonies sur gélose glucosée ne reproduisent pas la fermentation cellulosique, tandis qu'en réensemencant une « zone claire » obtenue en gélose profonde additionnée de cellulose divisée, la fermentation est normale. La spore de ce microbe

est particulièrement résistante : elle n'est tuée qu'après trente-sept minutes de chauffage à 115°. C'est grâce à cette propriété que le *Clostridium thermocellum* a pu être isolé.

Tétrault, qui l'étudie également, ne pense pas qu'il soit pur. A la forme filamenteuse de Viljoen succéderaient des formes coccoïdes qu'on observe dans les colonies sur la gélose de Kellermann. Il semble cependant difficile d'admettre que de telles formes coccoïdes aient pu, dans les essais de Viljoen, résister trente-cinq minutes à 115° et passer inaperçues. Tétrault met en évidence, parmi les produits de fermentation de la cellulose, un sucre réducteur, sans avoir besoin même d'ajouter du toluène ni de modifier la température.

Woodman et Stewart isolent un anaérobie facultatif, large bâtonnet sporulé qui se colore par la méthode de Gram. Il donne des colonies sur gélose, mais perd, après plusieurs cultures sur milieu solide, son pouvoir fermentaire. Par addition de toluène, on peut caractériser le glucose.

Coolhas décrit le seul aérobie thermophile connu : le *Bac. thermocellolyticus* qui donne sur cellulose-agar des colonies entourées d'une zone claire. Malheureusement, si on repique ces colonies en milieu liquide, la cellulose n'est pas attaquée. Le *Bac. thermocellolyticus* est un bâtonnet qui se colore par la méthode de Gram, porte une grosse spore excentrique et décompose la cellulose en la colorant et en donnant du gaz carbonique et de l'hydrogène.

Coolhas, ne pouvant obtenir de fermentation avec une espèce pure, ne cherche pas à modifier ses milieux. Il doute de la pureté des souches isolées par d'autres auteurs et pense que la décomposition anaérobie de la cellulose est due à l'action combinée de deux organismes : l'un aérobie, qui attaque la cellulose, l'autre anaérobie, qui produirait les gaz.

*
* *

Dans la nature les organismes qui détruisent la cellulose aux environs de 60° jouent un rôle qui n'est pas négligeable et qui, par exemple, dans la maturation des fumiers, n'a jamais été discuté.

Il n'est pas exceptionnel que la température monte jusqu'à 70°

à la base des tas de fumier et devienne par conséquent propice au développement des bactéries thermophiles.

Il n'est pas exceptionnel, non plus, que dans les sols où la fermentation est active la température soit élevée, favorisant ainsi les microbes thermophiles.

Enfin, la température des herbivores, d'environ 40°, permet, sinon aux véritables thermophiles, du moins aux thermotolérants comme le *Bac. cellulosaë dissolvens* de décomposer la cellulose, qui acquiert, de la sorte, une grande valeur nutritive.

IMPORTANCE DE LA DÉCOMPOSITION DE LA CELLULOSE

Un grand nombre de recherches ont été faites pour savoir comment la cellulose est dissoute dans le tube digestif de l'homme et des animaux. Elles ont montré que, seul, le suc hépato-pancréatique de l'escargot contient une cellulase, et que toutes les autres enzymes connues n'ont pas d'action sur la cellulose. Ce sont les bactéries qui la dissolvent et lui donnent une valeur nutritive égale, pour les herbivores, par exemple, à 80 0/0 de celle de l'amidon. Les produits de l'activité bactérienne, sauf les gaz évidemment, sont tous assimilables. L'alcool, les acides, les polyholosides ont une certaine valeur nutritive, mais c'est surtout le glucose, retrouvé souvent dans les milieux de culture, qui donne à la cellulose son importance alimentaire.

Woodman et Stewart croient que la cellulose est hydrolysée d'abord en cellobiose, puis en glucose, de même que l'amidon l'est en maltose et en glucose.

Il n'y a aucune raison pour que ce glucose d'origine bactérienne soit moins assimilable que celui des aliments ou qu'il soit plus facilement décomposé par d'autres microbes.

Dans le sol, l'importance des fermentations bactériennes de la cellulose est également grande.

Si le carbone de l'air, transformé en cellulose par la fonction chlorophyllienne, n'était pas rapidement remis en circulation, l'atmosphère s'appauvrirait en anhydride carbonique. L'activité des bactéries que nous venons d'étudier contribue à maintenir constante la composition de l'atmosphère.

La cellulose est transformée en gaz carbonique et en eau soit directement par les espèces cellulolytiques, soit indirectement par les autres microorganismes qui vivent dans le sol et qui oxydent

l'hydrogène, le méthane, l'alcool, les acides, les sucres et les polysaccharides. Il ne reste dans l'humus, comme le dit Waksman, que le carbone fixé par le protoplasme des infiniment petits.

Parmi les bactéries qui se servent des produits de la fermentation cellulosique, pour la fertilité des sols les plus intéressantes sont celles qui transforment les nitrates en nitrites et celles qui fixent l'azote atmosphérique.

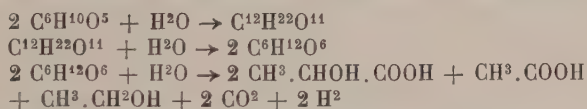
Certaines bactéries dénitrifiantes vivent en symbiose avec le *Bac. cellaresolvens*, et les *Azotobacters*, comme le montre Winogradsky, transforment l'azote de l'air en azote ammoniacal quand on leur donne comme source de carbone tous ces produits de fermentation.

Le cycle de l'azote se trouve ainsi lié intimement à celui du carbone.

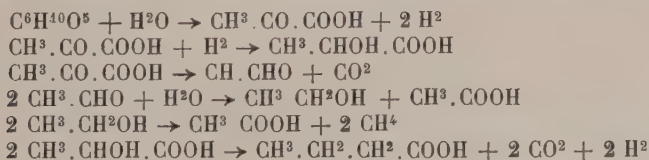
*
* *

Quelle suite de réactions a été proposée pour expliquer la décomposition de la cellulose ?

Par hydrolyses successives on peut rendre compte de la formation du cellobiose, du glucose, de l'alcool, des acides et des gaz :



En réalité, les analyses quantitatives de tous ces corps ne permettent pas d'affirmer que ces schémas sont exacts, pas plus d'ailleurs que celui de Lymn et Langwell qui se rapproche de ceux par lesquels Neuberg explique la fermentation alcoolique :



L'acide pyruvique n'a jamais été mis en évidence ; en revanche l'acétaldéhyde a été trouvé par Neuberg et Cohn.

Tous ces schémas n'ont pour le moment qu'une valeur théorique. De nouvelles études quantitatives leur donneront peut-être une valeur réelle.

DEUXIÈME PARTIE

SYNTHÈSE DE LA CELLULOSE PAR L'*ACETOBACTER XYLINUM*

L'étude de la synthèse de la cellulose par certaines bactéries ne fait que commencer, non pas que ces bactéries fussent inconnues, mais parce qu'on s'est occupé surtout de leurs propriétés cétogènes et acidogènes. Ces bactéries se trouvent notamment dans la mère du vinaigre, épaisse membrane qui recouvre la surface des liquides en fermentation.

Gabriel Bertrand a isolé et particulièrement étudié une espèce, la Bactérie du sorbose ou *Acetobacter xylinum*, mais d'un point de vue tout à fait différent de celui qui sera le nôtre. Il a montré que cet *Acetobacter* est un agent remarquable de synthèse biochimique de cétooses, d'acides alcools ou d'acides cétoniques.

Mais la véritable nature de la membrane qui recouvre la surface des liquides en fermentation a été longtemps méconnue. On sait, depuis quelques années seulement d'une manière certaine, qu'elle est cellulosique et non chitineuse, encore qu'elle renferme toujours, à l'état brut, 1,8 0/0 d'azote. Après l'avoir purifiée par la soude à 2 0/0, l'hypochlorite à 0,5 0/0, l'alcool, le chloroforme et l'éther, Sutra montre qu'elle ne renferme plus d'azote, et par l'analyse élémentaire y révèle 44,4 0/0 de carbone, le même pourcentage que celui de la cellulose de coton.

Les études aux rayons X, de Mark et Susitch, d'Eggel et Luft, et les études que nous avons faites, en collaboration avec Champetier et Sutra, d'une membrane simplement lavée et séchée, permettent d'affirmer que la disposition et l'écartement des plans

réticulaires des cristallites sont les mêmes dans la cellulose bactérienne et dans la cellulose de ramie. Les dimensions de la maille élémentaire, la disposition des chaînes cellulosiques sont les mêmes dans les deux celluloses, lesquelles diffèrent néanmoins par le groupement des cristallites. Dans les fibres végétales, ces cristallites sont disposés suivant une hélice dont le pas dépend de la fibre, tandis que dans la cellulose de l'*Acetobacter xylinum* ils sont réunis en couches parallèles. Dans chaque couche, leur orientation est différente, et si, par tension, on les dispose parallèlement, les cercles des diagrammes se résolvent en croissants qui rappellent ceux de la fibre de coton Jumel.

Les cercles de diffraction que donne la cellulose de l'*Acetobacter xylinum* sont plus étroits, plus nets que ceux du coton. La cellulose bactérienne est donc mieux cristallisée que la cellulose végétale. Elle est aussi plus résistante aux réactifs chimiques. Pour en préparer les dérivés, pour la dissoudre dans la liqueur de Schweizer, il faut la pulvériser finement et tamiser la poudre, et même alors l'attaque est lente.

Gonflée par la soude à 20 0/0 ou reprecipitée de sa solution dans la liqueur de Schweizer, la cellulose bactérienne donne le même diagramme que la cellulose mercerisée du coton.

Par nitration on obtient un dérivé dont le diagramme est identique à celui du nitrocoton. Après dénitration on retrouve le diagramme de la cellulose naturelle.

Les celluloses acétylées que Hibbert et Barsha préparent avec la membrane de l'*Acetobacter xylinum* ont la même constitution et les mêmes propriétés que les celluloses acétylées des linters de coton.

L'ensemble de ces faits prouve que cette membrane est de nature cellulosique et que la cellulose bactérienne a toutes les propriétés de la cellulose végétale.

Comme il est facile de modifier les conditions de culture d'une bactérie et de connaître son métabolisme, nous avons pensé qu'une étude quantitative de la synthèse de la cellulose par l'*Acetobacter xylinum* en expliquerait le mécanisme et nous acheminerait à la connaissance de la synthèse cellulosique par les végétaux.

Avant de donner les résultats de bilans établis avec des polyalcools, nous rappellerons quelques caractères, quelques propriétés de l'*Acetobacter xylinum*.

CARACTÈRES ET PROPRIÉTÉS DE *L'ACETOBACTER XYLINUM*

C'est un gros bâtonnet aérobie qui se colore par la méthode de Gram et qui laisse voir, dans les vieilles cultures, des formes d'involution dont il est difficile de dire si elles sont des spores.

L'Acetobacter xylinum se développe entre 27 et 29° et ne conserve ses propriétés oxydantes que dans les jus de fruits acides (sorbes, cerises, etc.).

L'optimum de la réaction du milieu varie suivant les auteurs. Pour certains il est voisin de pH 5, pour d'autres de pH 7. Mais la plupart des cultures ont été faites à un pH voisin de ce dernier, qui est celui de l'eau de levure, souvent employée.

La manière dont se forme la membrane mérite d'être décrite. Un jour ou deux après l'ensemencement, on voit, au fond du ballon de culture, une pellicule très mince, et, 48 heures plus tard environ, toute la masse liquide semble prise en gelée. Lorsque avec un fil de platine on en saisit un peu, il ne reste rapidement, au bout du fil, qu'une parcelle de zooglée dont le liquide est presque tout à fait sorti. Peu à peu la surface du milieu se recouvre d'une membrane transparente, mais opaque lorsqu'elle a une certaine épaisseur. A la partie inférieure de cette membrane on trouve toujours une masse translucide ayant la consistance de gelée molle du début.

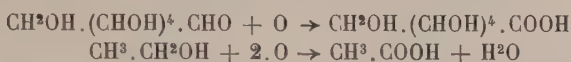
Si l'on fait des coupes de la membrane sèche, on voit qu'elle est composée de couches parallèles. Il semble que les zooglées se forment successivement et viennent se réunir à la surface du milieu.

L'Acetobacter xylinum est un agent d'oxydation. En réalité, l'oxygène de l'air agit tantôt comme accepteur d'hydrogène, tantôt

comme oxydant. Quand on donne à la bactérie des polyalcools, il y a déshydrogénation. La glycérine, par exemple, est transformée en dioxyacétone :



Mais quand on lui donne un aldose ou un alcool, il y a véritable oxydation. C'est ainsi que le glucose est transformé en acide gluconique, et l'alcool éthylique en acide acétique :



Marguerite Cozic montre que l'oxygène, quand il joue le rôle d'accepteur d'hydrogène, peut être suppléé par un colorant comme la thionine, et que la glycérine alors est oxydée en dioxyacétone en même temps que se forme une petite zooglee. Mais les données quantitatives manquent qui permettraient d'affirmer que dans ces conditions la culture anaérobie est en tous points semblable à la culture aérobie.

L'étude de la croissance de l'*Acetobacter xylinum*, en présence des indicateurs de potentiel d'oxydo-réduction, lui montre aussi que le potentiel, à pH 7, est voisin de — 150 millivolts et que le $r\text{H}_2$ est d'environ 8.

On a essayé l'action de l'*Acetobacter xylinum* sur un grand nombre de corps : alcools, polyalcools, aldoses, cétooses, polyoses, lactones, acide gluconique, etc. Si les avis sont partagés sur l'oxydation de quelques-uns de ces corps, cela tient, croyons-nous, à la diversité des techniques d'ensemencement et à des variations dans le pouvoir oxydant des races de bactéries.

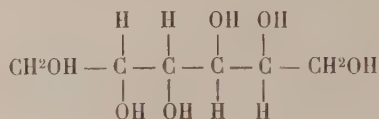
C'est ainsi, par exemple, que G. Bertrand oxyde l'arabite en un sucre cétonique : l'arabinulose, tandis que Votoček prétend ne pouvoir obtenir ce sucre. Or, nous avons, avec une souche conservée depuis quatre ans sur jus de fruit, oxydé l'arabite et obtenu la membrane cellulosique de l'*Acetobacter xylinum*. Il suffit pour cela d'ensemencer abondamment, environ $1/2 \text{ cm}^3$ d'une jeune culture sur jus de cerises, c'est-à-dire, d'utiliser la technique que G. Bertrand préconise pour l'érythrite. Néanmoins le rendement en sucre est faible, l'oxydation lente et le poids de cellulose synthétisé petit.

Il semble que l'*Acetobacter* synthétise difficilement la cellulose avec un polyalcool à cinq atomes de carbone.

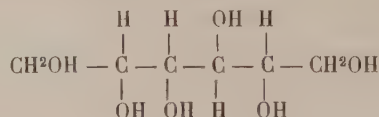
En suivant la même technique, nous avons également transformé la dulcité en sucre et obtenu de la cellulose. La quantité de sucre ne dépasse pas 15 0/0 du poids de l'alcool, alors qu'elle est, pour la mannite, de 55 0/0, et de 94 0/0 pour la sorbite. Le pouvoir réducteur n'apparaît qu'après une dizaine de jours, et le voile cellulosique reste mince pendant tout l'essai.

La structure stéréochimique des polyalcools influe donc sur l'oxydation et on peut dire avec G. Bertrand : seront difficiles à oxyder les alcools dont l'oxhydrile voisin de la fonction alcoolique primaire, est placé près d'un atome d'hydrogène.

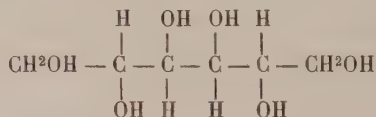
La mannite



donne facilement le lévulose ; la sorbite



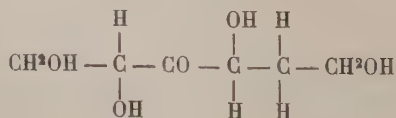
donne facilement le sorbose, et la dulcité



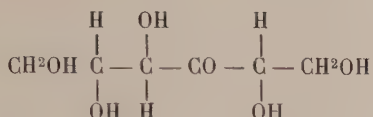
est difficilement oxydée.

Il est d'ailleurs vraisemblable, dans le cas de la dulcité, que ce n'est pas l'atome de carbone voisin de la fonction alcoolique primaire qui est oxydé, mais plutôt le troisième ou le quatrième. Bien que la réaction de Séliwanoff, en effet, soit positive, nous n'avons pu faire cristalliser du tagatose, ni obtenir de la galactosazone. Le sirop donne une osazone qui diffère de celle du galactose par sa forme cristalline et sa grande solubilité, à froid, dans les alcools éthylique et méthylique.

A ce cétose on peut donner les formules suivantes qui sont celles de deux inverses optiques :



ou :

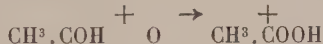
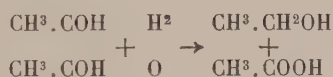


suivant que l'attaque porte sur le troisième ou sur le quatrième atome de carbone. Mais il est également possible que la molécule d'alcool soit scindée et que nous ayons un cétose dont le nombre des atomes de carbone soit inférieur à six.

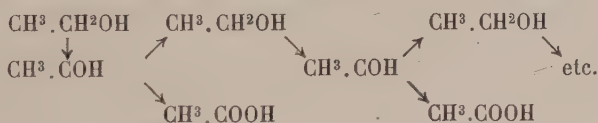
De nouvelles cultures nous feront mieux connaître le mécanisme de l'oxydation de la dulcité.

Parmi les diastases secrétées par l'*Acetobacter xylinum* Neuberger et Windisch, ainsi que Molinari, trouvent des aldéhydrases et des mutases. Les bactéries fraîches ou tuées par l'acétone, transforment les aldéhydes acétique, propionique, benzoïque, cinnamique et le citronellal en alcools et en acides correspondants.

L'acétaldéhyde, par exemple, donne de l'alcool éthylique et de l'acide acétique :



et comme l'aldéhyde provient de l'alcool on peut écrire :



MÉTABOLISME DE *L'ACETOBACTER XYLINUM*

Aucune recherche systématique des produits formés par cet *Acetobacter* n'a été faite pour expliquer la synthèse de la cellulose.

Seuls, Tarr et Hibbert ont pesé la membrane formée aux dépens du glucose, du galactose, du fructose, du mannose, du maltose, du lactose, du saccharose, du raffinose, de la glycérine, de la mannite, de la lévane et de l'amidon soluble en solution à 2,5 ou 5 0/0, à pH $5 \pm 0,1$. Leurs milieux sont ou purement synthétiques (asparagine 0,1 0/0, alcool éthylique 0,5 0/0, K^2HPO_4 0,5 à 1 0/0, NaCl 0,1 à 0,2 0/0, $MgSO_4$ 0,05 à 0,1 0/0, $Fe^2(SO_4)^3$ traces) ou bien à base d'eau de levure.

C'est avec la glycérine, la mannite et le fructose que Tarr et Hibbert ont les meilleurs rendements. Ils pensent que la synthèse de la cellulose se fait aisément à partir du fructose que donne, par oxydation, la mannite et que peut donner également la glycérine par condensation de la dioxycétone.

Avec les aldoses à 6 atomes de carbone, — surtout avec le galactose et le mannose, — et avec les diholosides, — surtout avec le lactose, — les rendements sont moins bons. Avec les pentoses, les glycols, les polyglycols, l' α -méthyl-glycérine et l' α -méthyl-glucoside, la synthèse ne se fait pas.

Tarr et Hibbert disent également que l'érythrite, ou plutôt les tétroses, ne sont pas favorables à la synthèse cellulosique. Comme ils n'indiquent pas si dans leurs cultures sur eau de levure qui se comportent à peu près comme les témoins, il y a production d'érythrulose, leur conclusion est difficilement acceptable.

Nous avons pu toujours oxyder l'érythrite et obtenir de la cellulose. La souche de Tarr et Hibbert n'est probablement pas très

oxydante et n'attaque que l'alcool éthylique ajouté dans tous les milieux.

Toutes nos cultures sont faites avec de l'eau de levure à 5 g. environ d'extrait sec par litre. Nous préférons la levure de boulangerie (Springer) à la levure de brasserie qui contient souvent des produits empêchant l'*Acetobacter xylinum* de pousser. Pour avoir une eau de levure dont la composition est comparable d'un essai à l'autre, nous desséchons à 37° plusieurs kilogrammes de levure fraîche et nous préparons chaque litre de décoction avec 35 g. environ de cette levure sèche. Un premier dosage de l'extrait sec permet de faire les dilutions et un deuxième donne le poids exact de cet extrait, lequel dans nos cultures a varié entre 4 g. 65 et 5 g. 25 par litre.

A cette eau de levure nous ajoutons 3 0/0 d'érythrite ou d'arabite ou de mannite ou de sorbite ou de dulcite ou d' α -glucoheptite ou bien 5 0/0 de glycérine. La réaction du milieu prise avec l'électrode de quinhydrone est voisine de pH 7 ou 7,2. Cent ou deux cents centimètres cubes sont stérilisés à l'autoclave pendant vingt minutes à 110-115°, dans des flacons jaugés en verre pyrex d'environ 5 litres. On s'assure de la stérilité des milieux en les laissant quelques jours à l'étuve entre 27 et 28°. On les ensemence alors soit avec une parcelle de jeune zooglye, soit avec 5 à 6 gouttes d'une culture fraîche sur jus de cerise. Les flacons sont ensuite fermés avec un bouchon de caoutchouc muni d'une soupape qui permet à l'air d'entrer, mais non aux gaz de sortir. Après quelques heures de séjour à l'étuve, on verse de l'eau dans la soupape. Les rentrées d'air se font régulièrement, sans qu'il y ait dépression ou surpression. Par une tubulure latérale on peut faire les prises de gaz.

Pour chaque essai nous préparons un témoin et 3 cultures, dont une sur eau de levure.

Sur le témoin nous recherchons tous les corps retrouvés dans les cultures et nous déterminons le poids sec de 20 cm³ pour connaître la quantité d'eau évaporée.

L'*Acetobacter xylinum* ne commence à pousser sur l'eau de levure qu'après une dizaine de jours. La zooglye de 25 à 45 jours pèse 2 à 4 mg., et son métabolisme est négligeable. La réaction du milieu ne change pas, aucun des corps que donnent les polyalcools

ne peut être décelé, et les échanges gazeux sont, pour 4 mg. de zooglée, de 3 cm³ de gaz carbonique et de 15 cm³ d'oxygène.

Notre étude du métabolisme de l'*Acetobacter xylinum* a porté sur les gaz, les acides fixes et volatils, l'aldéhyde, l'alcool, le sucre et la cellulose. Enfin, nous avons fait des bilans de carbone en dosant le carbone de l'extrait sec du témoin et de la culture, en le dosant aussi dans la membrane brute, mais en le calculant pour les autres corps.

Les analyses de gaz sont faites avec l'appareil de Plantefol sur une prise de 100 centimètres cubes. Nous connaissons ainsi le dégagement de gaz carbonique, l'absorption d'oxygène et l'augmentation de la teneur en azote. Cette dernière nous permet de calculer la rentrée d'air.

Les acides sont dosés par la soude N/10, avant et après entraînement par la vapeur d'eau. Nous exprimons l'acidité totale en acide acétique.

L'aldéhyde est distillé, en milieu légèrement sulfurique, dans une solution de bisulfite de sodium. Après avoir neutralisé l'excès de bisulfite par l'iode, on décompose la combinaison bisulfitique par le bicarbonate de sodium et l'on dose par l'iode N/100 le bisulfite libéré.

L'alcool est distillé, en milieu neutre, dans une solution de bichromate de potassium sulfurique, et on détermine la quantité de bichromate réduit par l'alun de fer ammoniacal.

Les sucres sont dosés par réduction de la liqueur cupro-potassique, selon la méthode de G. Bertrand. On connaît le pouvoir réducteur de la dioxyacétone, du lévulose, du sorbose et de l' α -glucoheptulose, mais on ignore celui des autres sucres que nous avons obtenus. Nous avons donc exprimé le pouvoir réducteur de l'arabinulose en arabinose et celui de l'érythrulose et du cétose que donne la dulcité en glucose.

Si du poids de la membrane brute, exprimée, lavée plusieurs fois dans de l'eau bouillante, on retranche 10,8 0/0, chiffre qui correspond en protéides à l'azote qu'elle renferme, on obtient la quantité de cellulose que l'*Acetobacter xylinum* a produite.

La membrane brute contient 45 0/0 de son poids de carbone, et c'est ce chiffre qui nous a servi dans l'établissement des bilans de carbone.

Le dosage du carbone est fait par la semi-micro-méthode de

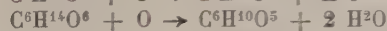
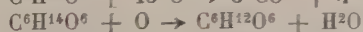
H. Ter Meulen sur l'extrait sec de 20 centimètres cubes. Cet extrait est parfois assez long à obtenir, en particulier avec les cultures sur érythrite, car l'érythrulose est sirupeux. Il faut dessécher près d'un mois dans le vide sulfurique entre 27 et 28°, puis dans le vide sur anhydride phosphorique. Avec la glycérine et la dioxyacétone, il est préférable d'abandonner cette technique qui donne de mauvais résultats. Nous nous sommes contentée, pour le moment, d'établir des bilans de fermentation.

Les chiffres que nous donnons ci-dessous se rapportent à six cultures de trois semaines, une de quinze jours et une de onze jours sur 6 g. de mannite ou de sorbite, ainsi qu'à deux de trente jours sur 6 g. de dulcité, et à deux de vingt et un jours et de trente jours sur 6 g. d'érythrite.

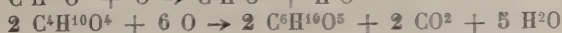
TABLEAU I

		O ² restant 0/0	O ² con- sommé mg.	CO ² mg.	Sucre mg.	Mem- brane brute mg.	pH	Acide mg.	Alcool mg.
Erythrite.	21 j.	40,75	622	260	3895	406	—	119	—
Erythrite.	30 j.	40,46	731	270	4384	402	—	243	30
Mannite .	11 j.	48,98	435	65	618	150	6,9	6	—
Mannite .	15 j.	41,87	727	412	2777	760	6,0	23	—
Mannite .	21 j.	3,40	1276	1056	3357	1150	4,5	48	9
Sorbite .	11 j.	20,18	44	40	366	17	7,2	—	—
Sorbite .	15 j.	48,45	490	65	1530	50	6,8	15	—
Sorbite .	21 j.	40,20	715	358	5649	400	6,5	35	17
Dulcité .	30 j.	41,47	603	734	352	400	—	78	30

Si nous retranchons 10,8 0/0 du poids de la membrane brute, chiffre qui correspond aux protéides, et si nous supposons pour les alcools à six atomes de carbone :



et pour l'érythrite :



ces chiffres exprimés en alcools transformés donnent :

TABLEAU II

		CO ² mg.	Sucre mg.	Cellulose mg.	Acide mg.	Total mg.
Erythrite .	21 j.	120	3933	144	—	4197
Erythrite .	30 j.	152	4427	138	—	4717
Mannite. .	11 j.	45	624	156	6	831
Mannite. .	15 j.	284	2807	762	23	3876
Mannite. .	21 j.	727	3404	1152	43	5326
Sorbite . .	11 j.	6	370	16	—	392
Sorbite . .	15 j.	44	1547	45	12	1648
Sorbite . .	21 j.	246	5706	99	34	6085
Dulcite . .	30 j.	500	355	99	77	1031

Pour la mannite, la sorbite et pour les cultures de 21 jours sur érythrite, les bilans de carbone s'établissent ainsi :

TABLEAU III

		CO ² mg.	Poids sec mg.	Mem- brane mg.	Acide mg.	Alcool mg.	Carbone total retrouvé mg.	Carbone total du témoin mg.
Erythrite .	21 j.	78	2509	50	48	5	2690	2754
Mannite. .	11 j.	17	2574	75	2	—	2668	2750
Mannite. .	15 j.	112	2329	384	9	—	2834	2713
Mannite. .	21 j.	287	1931	517	17	4	2756	2770
Sorbite . .	11 j.	2	2709	8	—	—	2749	2761
Sorbite . .	15 j.	12	2720	20	5	—	2757	2761
Sorbite . .	21 j.	97	2471	45	13	10	2635	2698

Le rapport acide total : acide volatil est d'à peu près 2 pour la mannite, de 8 pour l'érythrite et de 1 pour la sorbite.

L'acide fixe n'est pas connu. L'acide volatil qu'on obtient aux dépens de la sorbite donne, avec le nitrate d'argent, un précipité blanc qui noircit par le chauffage ; avec le perchlorure de fer une coloration rouge qui vire au jaune par l'acide chlorhydrique, et avec l'acétate neutre de plomb un précipité blanc soluble à chaud. Il ne donne pas avec l'alcool et l'acide sulfurique concentré une odeur d'éther acétique. C'est donc de l'acide formique.

Nous n'avons jamais retrouvé d'aldéhyde. Le nombre des centimètres cubes d'iode N/100 trouvé pour la culture est toujours égal à celui du témoin. S'il se forme un aldéhyde, ce doit être d'une manière transitoire.

Les chiffres des tableaux ci-dessus nous permettent de dire que :

1° On retrouve pratiquement tout le carbone mis en œuvre.

2° Pour les cultures de 21 jours toute la sorbite est oxydée, tandis qu'il reste 0 g. 647 de mannite et plus de 1 g. d'érythrite. Pour les cultures de 30 jours il reste environ 1 g. d'érythrite et 5 g. de dulcité.

Cela s'explique facilement : avec la mannite l'oxygène est presque entièrement disparu ; avec l'érythrite, et surtout avec la dulcité, la fermentation n'est pas terminée, même après 30 jours.

3° L'*Acetobacter xylinum* brûle d'une façon banale plus de mannite que de dulcité, plus de dulcité que de sorbite, plus de sorbite que d'érythrite. Mais c'est aussi à partir de la mannite qu'il synthétise le plus de cellulose. En revanche c'est avec la sorbite que le rendement en sucre est le meilleur.

On peut aussi calculer la quantité d'alcool brûlé par milligramme de sucre et par milligramme de cellulose et comparer les rapports $\text{CO}^2 : \text{O}^2$ avec les rapports théoriques de la combustion des alcools.

Ces rendements et rapports sont résumés dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU IV

		CO ²	Sucre	Cellulose	Alcool brûlé Sucre	Alcool brûlé Cellulose	CO ² mg.	CO ² mg.
		Alcool	Alcool	Alcool			O ² mg.	O ² mg.
		0/0	0/0	0/0			trouvé	théorique
Erythrite.	21 j.	4,33	65	2,40	0,03	1,26	0,41	1,22
Erythrite.	30 j.	4,50	73	2,30	0,03	1,66	0,36	
Mannite .	11 j.	1,08	10,30	2,6	0,07	0,36	0,48	
Mannite .	15 j.	6,86	46,28	12,7	0,10	0,41	0,56	
Mannite .	21 j.	17,6	55,95	19,2	0,21	1,00	0,82	1,28
Sorbite .	11 j.	0,15	6,10	0,26	0,01	0,64	0,22	
Sorbite .	15 j.	1,08	25,5	0,75	0,02	1,00	0,34	
Sorbite .	21 j.	5,96	94,15	1,65	0,04	2,79	0,50	
Dulcité .	30 j.	12,23	5,86	1,65	1,41	5,08	1,21	

De ce tableau il ressort que l'*Acetobacter xylinum* brûle, par milligramme de cellulose synthétisée, plus de dulcite que de sorbite, plus de sorbite que d'érythrite, plus d'érythrite que de mannite.

Nous avons déjà remarqué l'influence de la structure stéréochimique de la dulcite dans la production du cétose : nous retrouvons dans la synthèse cellulosique cette même influence et nous pouvons dire que non seulement l'*Acetobacter xylinum* utilise de préférence un alcool à un autre dans la série des alcools à six atomes de carbone, mais encore qu'il utilise mieux un alcool en C⁴ que certains alcools en C⁶.

Ce dernier résultat est tout à fait inattendu. Il laisserait croire que les grosses molécules se scindent et que la synthèse de la cellulose se fait par condensation des molécules de poids faible.

Le tableau ci-dessus montre encore qu'il y a peu de mannite ou de sorbite brûlée lorsque les cultures sont jeunes. Le rapport $\text{CO}^2 : \text{O}^2$ est en effet très éloigné d'un rapport théorique de combustion. L'oxygène sert principalement aux synthèses. La quantité d'alcool qui brûle augmente avec l'âge des cultures et se rapproche, surtout pour la mannite, du chiffre calculé.

Pour la dulcite, le rapport $\text{CO}^2 : \text{O}^2$ est presque égal à un rapport de combustion, tandis qu'il n'est pas très élevé pour l'érythrite et qu'il ne varie pas avec l'âge des cultures.

Nous ferons encore une remarque à propos de cette première série de synthèses : avec l'érythrite, la sorbite et la dulcite il reste au moins 10 0/0 d'oxygène à la fin de l'essai, tandis qu'avec la mannite il n'en reste en moyenne que 3,4 0/0, parfois même 0,15 0/0.

Bien que cela prouve que l'*Acetobacter xylinum* est capable d'utiliser l'oxygène à de très faibles pressions, nous pouvons croire que son métabolisme n'est pas le même en aérobiose qu'en anaérobiose partielle. C'est pourquoi nous avons refait des cultures avec 100 cm³ d'eau de levure et 3 g. d'érythrite, ou de mannite, ou de sorbite, ou de dulcite dans les mêmes flacons d'environ 5 litres, doublant ainsi le volume de l'air pour un même poids d'alcool.

Nous avons également étendu nos recherches à d'autres poly-alcools : arabite, α -glucoheptite en solution à 3 0/0 et glycérine en solution à 5 0/0,

Nous nous sommes placée exactement dans les conditions de nos premiers essais, faisant, avec les mêmes techniques, les mêmes dosages.

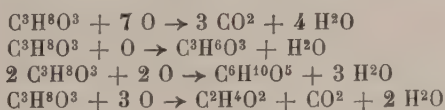
Les chiffres que nous donnons ci-dessous se rapportent à une culture de 25 jours sur glycérine, à une de 10 jours et 3 de 21 jours sur érythrite, à une de 21 jours et une de 45 jours sur arabite, à trois de 21 jours sur mannite, à une de 21 jours sur sorbite, à une de 19 jours et deux de 45 jours sur dulcité, enfin à une de 11 jours, une de 15 jours et trois de 21 jours sur α -glucoheptite.

TABLEAU V

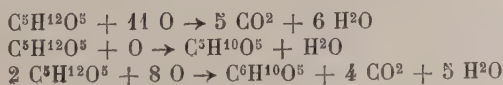
		O ² restant 0/0	O ² con- sommé mg.	CO ² mg.	Sucre mg.	Mem- brane brute mg.	pH	Acide mg.	Alcool mg.
Glycérine	25 j.	12,97	565	256	2601	119	3,6	94	40
Erythrite.	10 j.	16,91	224	76	1215	32	—	91	15
Erythrite.	21 j.	15,45	302	78	1632	38	—	—	—
Arabite .	21 j.	18,30	168	202	450	59	—	—	traces
Arabite .	45 j.	18,57	163	215	335	33	6,1	20	traces
Mannite .	21 j.	5,65	1028	1188	1570	243	4,0	60	—
Sorbite .	21 j.	14,87	428	328	2376	97	6,9	10	traces
Dulcité .	19 j.	18,82	127	158	288	29	5,1	48	—
Dulcité .	45 j.	17,00	298	294	446	34	5,1	51	—
Heptite .	11 j.	15,48	353	272	3024	108	7,1	—	traces
Heptite .	15 j.	15,00	398	331	3024	74	7,0	11	traces
Heptite .	21 j.	15,10	359	298	2974	94	6,9	17	traces

Les équations que nous avons proposées à la page 33 pour les alcools à quatre et à six atomes de carbone nous serviront encore ici.

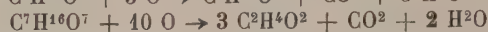
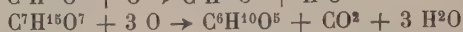
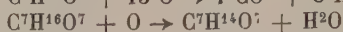
Nous pouvons écrire en outre pour la glycérine :



pour l'arabite :



et pour l' α -glucoheptite :



Nous retranchons également 10,8 0/0 du poids de la membrane brute pour avoir celui de la cellulose pure et nous obtenons les chiffres suivants qui indiquent le poids d'alcool transformé en gaz carbonique, en sucre, en cellulose et en acide :

TABLEAU VI

		CO ² mg.	Sucre mg.	Cellulose mg.	Acide mg.	Total mg.
Glycérine . . .	25 j.	178	2658	121	139	3096
Erythrite . . .	10 j.	41	1235	21	—	1297
Erythrite . . .	21 j.	59	1658	25	—	1742
Arabite . . .	21 j.	100	456	99	—	645
Arabite . . .	45 j.	125	336	56	—	517
Mannite . . .	21 j.	819	1580	243	60	2702
Sorbite . . .	21 j.	226	2402	97	10	2735
Dulcite . . .	19 j.	113	290	28	48	479
Dulcite . . .	45 j.	204	451	34	51	740
Heptite . . .	11 j.	162	3053	125	—	3340
Heptite . . .	15 j.	220	3053	88	10	3371
Heptite . . .	21 j.	298	3000	111	15	3424

Pour les cultures de 10 jours sur érythrite, de 45 jours sur arabite, de 45 jours sur dulcite et pour les cultures sur α -glucoheptite, les bilans de carbone s'établissent ainsi :

TABLEAU VII

		CO ² mg.	Poids sec mg.	Mem- brane mg.	Acide mg.	Alcool mg.	Carbone total retrouvé mg.	Carbone total du témoin mg.
Erythrite . . .	10 j.	21	1421	36	20	14	1512	1566
Arabite . . .	45 j.	58	1236	29	—	—	1323	1398
Dulcite . . .	45 j.	80	1176	15	19	10	1300	1376
Heptite . . .	11 j.	74	1344	48	—	—	1466	1388
Heptite . . .	15 j.	90	1344	33	4	—	1471	1388
Heptite . . .	21 j.	81	1265	42	4	—	1392	1375

Il y a presque autant d'acide volatil que d'acide fixe avec la sorbite, la mannite et la dulcité, alors qu'il y a peu d'acide volatil avec la glycérine et l'érythrite.

Les acides fixes ne sont pas connus, mais l'acide volatil qu'on obtient aux dépens de la glycérine est de l'acide formique.

Jamais nous n'avons pu déceler, même avec la glycérine, de corps aldéhydiques.

Les chiffres des tableaux V, VI et VII nous permettent de dire que :

1° Le pourcentage d'oxygène qui reste à la fin des cultures est au moins de 15 0/0, sauf pour la glycérine où il est de 13 0/0 et pour la mannite où il n'est plus que de 5,65 0/0. A part cette dernière, nos cultures sont toujours restées dans des conditions voisines de l'aérobiose.

2° On retrouve le carbone mis en œuvre à ± 5 0/0 près.

3° L' α -glucoheptite disparaît entièrement, la mannite et la sorbite presque entièrement, mais il n'y a guère plus de 60 0/0 de glycérine, 50 0/0 d'érythrite et 20 0/0 d'arabite et de dulcité qui soient transformées.

Dans le cas de l' α -glucoheptite le pouvoir réducteur total exprimé en α -glucoheptulose représente à lui seul l'alcool mis en culture. Il est donc vraisemblable que l'*Acetobacter xylinum* scinde la molécule d'alcool pour donner des sucres plus réducteurs que l'heptulose et de poids moléculaires moins élevés.

4° Avec l' α -glucoheptite il semble, pour une raison qui nous échappe mais qui tient peut-être à l'ensemencement, que la culture est terminée dès le onzième jour avec les rendements les meilleurs en cellulose et avec les moins bons en gaz carbonique. D'une culture à l'autre, les quantités varient en sens inverse.

Les cultures sur arabite montrent que les poids de sucre et de cellulose varient dans le même sens et que les poids de gaz carbonique varient en sens contraire de ces derniers.

Nous voyons déjà par ces deux corps, que l'alcool brûle inutilement dans certains cas.

5° L'*Acetobacter xylinum* brûle d'une façon banale plus de mannite que de sorbite ou d'heptite, plus de sorbite que de glycérine ou d'arabite, plus d'arabite que d'érythrite.

C'est avec la mannite qu'il synthétise le plus de cellulose, mais il en fait autant avec la sorbite qu'avec l' α -glucoheptite, et

40 DÉCOMPOSITION ET SYNTHÈSE DE LA CELLULOSE PAR LES BACTÉRIES
c'est avec cette dernière que le rendement en sucre est le meilleur.

Nous calculerons également ici la quantité d'alcool qui brûle par milligramme de sucre et par milligramme de cellulose et nous comparerons le rapport $\text{CO}^2 : \text{O}^2$ aux rapports théoriques de la combustion des alcools.

TABLEAU VIII

		CO^2	Sucre	Cellulose	Alcool	Alcool	CO^2 mg.	CO^2 mg.
		Alcool	Alcool	Alcool	brûlé	brûlé	O^2 mg.	O^2 mg.
		0/0	0/0	0/0	Sucre	Cellulose	trouvé	théorique
Glycérine	25 j.	8,53	52	3,5	0,06	1,66	0,45	1,46
Erythrite.	10 j.	2,53	40,5	0,9	0,03	1,51	0,33	1,22
Erythrite.	21 j.	2,60	54,4	0,11	0,04	1,73	0,25	
Arabite	21 j.	6,13	15	0,19	0,21	1,88	1,20	1,53
Arabite	45 j.	7,16	11,46	0,09	0,37	4,16	1,31	
Mannite	21 j.	39,6	52,33	7,23	5,2	3,77	1,15	1,28
Sorbit	21 j.	10,93	79,2	2,9	0,09	2,60	0,76	
Dulcité	19 j.	5,26	9,6	0,9	0,38	4,36	1,24	
Dulcité	45 j.	9,80	15	1	0,45	6,8	1	
Heptite	11 j.	9,06	100	3,2	0,05	1,67	0,76	1,70
Heptite	15 j.	11	100	2,2	0,07	3,33	0,83	
Heptite	21 j.	10	99	2,8	0,09	3,54	0,83	

Ce tableau montre que l'*Acetobacter xylinum* brûle, par milligramme de cellulose synthétisée, plus de dulcité que de mannite, autant de mannite que d' α -glucoheptite, plus de mannite que de sorbite et plus de sorbite que d'érythrite ou de glycérine.

Les deux chiffres donnés par l'arabite diffèrent beaucoup l'un de l'autre. Leur moyenne se rapproche du chiffre de la mannite.

Le rapport $\text{CO}^2 : \text{O}^2$ de l'arabite, de la mannite et de la dulcité est voisin d'un rapport de combustion : peu d'oxygène est utilisé pour les synthèses. Avec les autres alcools, au contraire, ce rapport $\text{CO}^2 : \text{O}^2$ n'est pas voisin d'un rapport de combustion : l'oxygène consommé sert surtout aux synthèses.

Si nous comparons maintenant les chiffres de la deuxième série avec ceux de la première, nous voyons que dans chacune d'elles, quand on passe d'un alcool à l'autre, les variations sont toujours dans le même sens. Mais si nous comparons les cultures sur man-

nite, nous sommes frappée de ce que les rapports alcool brûlé : cellulose ou alcool brûlé : sucre sont plus élevés en présence d'un excès d'oxygène qu'en anaérobiose partielle.

L'*Acetobacter xylinum*, après un certain laps de temps du moins, gaspille beaucoup d'alcool en aérobiose. Il en gaspille même tellement avec la mannite, ou peut-être avec le fructose qu'il forme à ses dépens, que les cultures sont, malgré nos précautions, partiellement anaérobies.

Ce gaspillage nous prouve que l'énergie de la respiration n'est pas indispensable aux synthèses.

La molécule $C^6H^{10}O^5$ se formerait d'ailleurs par réaction spontanée si les équations écrites aux pages 33, 37 et 38 sont exactes, et l'énergie nécessaire au travail de polymérisation peut être celle que libère la scission des polyalcools en corps intermédiaires plus ou moins stables, en acides et en alcool éthylique. Si la cellulose se forme, au contraire, après dédoublement des grosses molécules, l'énergie libérée dans ces réactions est suffisante vraisemblablement pour expliquer les synthèses.

CONCLUSIONS

On doit déjà à ces recherches sur le mécanisme de la synthèse de la cellulose ⁽¹⁾, qui ne font au surplus que commencer, des résultats fort intéressants dont nous allons dire les principaux.

Ces recherches prouvent que l'énergie de la respiration n'est pas utilisée pour les synthèses.

Elles apportent les premiers renseignements quantitatifs sur les bilans et sur les rendements des divers corps formés par l'*Acetobacter xylinum*.

Elles montrent d'une façon nette l'influence de la structure stéréochimique des polyalcools, non seulement sur la synthèse du sucre comme on le sait déjà depuis nombre d'années grâce à G. Bertrand, mais en outre sur la synthèse de la cellulose.

Elles ne manqueront pas, refaites avec les corps que nous venons d'étudier, mais refaites dans des conditions différentes, puis étendues progressivement à d'autres corps : polyalcools, sucres, alcools simples, de nous faire mieux connaître, en général, le métabolisme des bactéries et, en particulier, la synthèse de la cellulose.

⁽¹⁾ Voir à la fin de la première partie l'importance de la décomposition de la cellulose.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

La plupart des références bibliographiques concernant la décomposition de la cellulose se trouvent, lorsqu'elles sont antérieures à 1923, dans notre thèse de doctorat ès sciences, et, lorsqu'elles sont antérieures à 1931, dans *Principles of soil microbiology* de S. A. Waksman. C'est pourquoi nous ne mentionnons ci après, outre ces deux ouvrages, que les travaux postérieurs à 1931 et les travaux, échelonnés de 1923 à 1931, non cités par S. A. Waksman.

- F. BAKER. — Preliminary note on the rôle of coccoid micro-organisms in the disintegration of cell-wall substances. *Zentr. Bakt. A. II.*, 84, 1931, 452.
- G. BERTRAND. — Etude biochimique de la Bactérie du sorbose. *Ann. Chim. et Phys.*, 3, 1904 (8^e série), 181.
- R. BOJANOWSKY. — Ueber eisenbedürftige zellulosegerstörende Bakterien. *Zentr. Bakt. A. II.*, 88, 1933, 1.
- L. A. BRADLEY et L. F. RETTGER. — Studies on aerobic bacteria commonly concerned in the decomposition of cellulose. *J. Bact.*, 13, 1931, 321.
- G. CHAMPETIER. — La structure de la cellulose dans ses rapports avec la constitution des sucres. Herman et Cie, Paris, 1933.
- M. COZIC. — Etude biochimique de *Bacterium xylinum*. Thèse doct. sc. A. Lecot. Nemours, 1933.
- H. L. JENSEN. — The microbiology of farmyard manure decomposition in soil. II. Decomposition of cellulose. *J. Agr. Sc.*, 21, 1931, 81.
- H. HIBBERT et J. BARSHA. — Studies on reactions relating to carbohydrates and polysaccharides. XXXIX. Structure of the cellulose synthesised by the action of *Acetobacter xylinus* on glucose. *Can. Res. J.*, 5, 1931, 580.
- Y. KHOUVINE. — Digestion de la cellulose par la flore intestinale de l'homme. *B. cellulosa dissolvens*, n. sp. Thèse doct. sc. L. Maretheux. Paris, 1923, *Ann. Inst. Past.*, 37, 1923, 711.
- Le *Bacillus cellulosa dissolvens* et la fermentation de la cellulose. *C. R. Soc. Biol.*, 94, 1926, 1072.
- Synthèse de la cellulose par l'*Acetobacter xylinum* à partir de la mannite et de la sorbite. *C. R.*, 191, 1933, 1144.
- Synthèse de la cellulose par l'*Acetobacter xylinum* à partir de polyalcools en C³, C⁴, C⁵, C⁶ et C⁷. *C. R.*, 198, 1934, 1544.
- Y. KHOUVINE, G. CHAMPETIER et R. SUTRA. — Etude aux rayons X de la cellulose d'*Acetobacter xylinum*. *C. R.*, 194, 1933, 208.
- R. MEYER. — Beiträge zur Kenntnis der Cellulosezersetzung unter niedriger Sauerstoffspannung. *Ark. Mikr.*, 5, 1934, 185.
- E. MOLINARI. — Ueber die biochemische Dismutation nebst Untersuchungen über die Essiggärung. *Bioch. Zeitschr.*, 216, 1929, 187.

- C. NEUBERG et F. WINDISCH. — Ueber die Essigärung und die chemischen Leistungen der Essigbakterien. *Bioch. Zeitschr.*, 166, 1925, 454.
- J. POGHON. — Sur une bactérie cellulolytique isolée de la panse des ruminants. *C. R. Soc. Biol.*, 114, 1933, 1323.
- Influence du milieu de culture sur les propriétés biologiques d'une bactérie cellulolytique de la panse du bœuf. *C. R.*, 198, 1934, 1808.
- L. RUBENTSCHIK. — Ueber Sulfatreduktion durch Bakterien bei Zellulosegärungsprodukten als Energiequelle. *Zentr. Bakt. A. II.*, 73, 1928, 483.
- Zur Frage der aeroben Zellulosezersetzung bei hohen Salzkonzentrationen. *Zentr. Bakt. A. II.*, 76, 1928-29, 305.
- Zur anaeroben Zellulosezersetzung auf den Rieselfeldern. *Zentr. Bakt. A. II.*, 88, 1933, 186.
- C. E. SKINNER. — The decomposition of cellulose by type strains of certain bacteria. *Zentr. Bakt. A. II.*, 78, 1929, 508.
- S. SNIESZKO. — The isolation of a thermophilic cellulose fermenting organism. *Zentr. Bakt. A. II.*, 88, 1933, 403.
- R. SUTRA. — Etude sur les celluloses d'*Acetobacter xylinum* et de *Tuniciers*. *C. R.*, 195, 1932, 181.
- H. L. TARR et H. HIBBERT. — Studies on reactions relating to carbohydrates and polysaccharides. XXV. Polysaccharides synthesis by the action of *Acetobacter xylinus* on carbohydrates and related compounds. *Can. Res. J.*, 4, 1931, 372.
- R. TURNERÓWNA. — Spoztezenia naa drobnoustrojami tlenoweni rozkladajacerni blomik i agar. *Med. dów. spo.*, 37, 1933, 1.
- E. VOTOČEK, P. VALENTIN et F. RACÉ. — Etudes dans la série du rhamnose. *Coll. Trav. Tchec.*, 2^e année, 1930, 402.
- S. A. WAKSMAN. — Principles of soil microbiology. Baillière, Tindall et Cox. Londres, 1931.
- S. WINOGRADSKY. — Etudes sur la microbiologie du sol (6^e mémoire). Sur la synthèse de l'ammoniaque par les *Azotobacters* du sol. *Ann. Inst. Past.*, 48, 1932, 269.
- H. E. WOODMAN. — The mechanism of cellulose digestion in the ruminant organism. *J. Agr. Sc.*, 17, 1927, 333.
- H. E. WOODMAN et J. STEWART. — The mechanism of cellulose digestion in the ruminant organism. II. The transformation into glucose by the agency of cellulose splitting bacteria. *J. Agr. Sc.*, 18, 1928, 713.

VU : Le Président,
A. GORIS.

VU : Le Doyen de la Faculté,
PAUL GUÉRIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	3

PREMIÈRE PARTIE

DÉCOMPOSITION DE LA CELLULOSE PAR LES BACTÉRIES	6
Bactéries aérobies	8
Bactéries anaérobies	12
Bactéries thermophiles	19
Importance de la décomposition de la cellulose	22

DEUXIÈME PARTIE

SYNTHÈSE DE LA CELLULOSE PAR L' <i>Acetobacter xylinum</i>	24
Caractères et propriétés de l' <i>Acetobacter xylinum</i>	26
Métabolisme de l' <i>Acetobacter xylinum</i>	30
CONCLUSIONS	42



